

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.06.028

过表达甘油激酶三角褐指藻藻株富集油脂的研究

侯兴国¹, 方 琰¹, 白 欢², 胡莎莎¹, 卿人韦¹, 兰利琼¹

(1. 四川大学生命科学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;

2. 国网四川省电力公司电力科学研究院, 成都 610072)

摘要: 为了得到高产并符合生物柴油标准的微藻油脂的藻株, 本文研究了在外源甘油存在的情况下野生型(WT)三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*), 甘油激酶过表达藻株(GKOE)以及甘油激酶 RNA 干扰藻株(GKRNi)在添加浓度为 20 mmol/L 外源甘油的培养基中的生长情况、油脂产量以及脂肪酸组成. 结果显示: (1) 甘油兼养的 GKOE 藻细胞浓度可达到 2.23×10^7 个/mL, 明显高于甘油兼养的 WT 的 1.79×10^7 个/mL 和 GKRNi 的 1.78×10^7 个/mL; (2) 甘油兼养的 GKOE 油脂含量可达到 31.73%, 比甘油兼养的 WT 和 GKRNi 分别高了 27.20% 和 26.63%; (3) 尼罗红染色显示甘油兼养的 GKOE 荧光强度比甘油兼养的 WT 和 GKRNi 分别高 16.26% 和 17.83%; (4) 甘油兼养的 GKOE 总脂肪酸产量可达到 0.052 mg/mL, 比甘油兼养的 WT 和 GKRNi 高了 36.84% 和 10.64%, 说明其油脂适合于生物柴油开发.

关键词: 过表达甘油激酶三角褐指藻藻株; 油脂; 脂肪酸; 生物柴油

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2020)06-1209-08

Study on lipid accumulation of *Phaeodactylum tricornutum* strain overexpressing glycerol kinase

HOU Xing-Guo¹, FANG Yan¹, BAI Huan², HU Sha-Sha¹, QING Ren-Wei¹, LAN Li-Qiong¹

(1. Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education,

College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. Electric Power Research Institute of Sichuan Electric Power Company, Chengdu 610072, China)

Abstract: In order to obtain high-yield algae strains that meet biodiesel standards, the growth, lipid yield and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* wild-type(WT), *Phaeodactylum tricornutum* with glycerol kinase overexpression (GKOE) and glycerol kinase RNA interfered (GKRNi), which were cultured in a medium supplemented with 20 mmol/L exogenous glycerol, were investigated. The results showed that: (1) the cell concentration of GKOE in the medium with exogenous glycerol could reach 2.23×10^7 /mL, significantly higher than WT(1.79×10^7 /mL) and GKRNi(1.78×10^7 /mL) in the medium with exogenous glycerol; (2) the lipid content of GKOE in the medium with exogenous glycerol was up to 31.73%, which was much higher than WT(27.20%) and GKRNi(26.63%) in the medium with exogenous glycerol; (3) the fluorescence intensity of GKOE in the medium with exogenous glycerol was 16.26% and 17.83% higher than WT and GKRNi in the medium with exogenous glycerol

收稿日期: 2020-01-09

基金项目: 国家自然科学基金(40976092); 四川省电科院项目(13H1138)

作者简介: 侯兴国(1994-), 男, 四川南充人, 硕士研究生, 从事藻类学生物能源的相关研究. E-mail: 595178260@qq.com

通讯作者: 兰利琼. E-mail: lanlq@scu.edu.cn

by Nile red staining, respectively; (4) the total fatty acid yield of GKOE reached 0.052 mg/mL, which was 16.26% and 17.83% higher than WT and GKRNi in the medium with exogenous glycerol, and suitable for biodiesel development.

Keywords: *Phaeodactyllum tricornutum* with glycerol kinase overexpression; Lipid; Fatty acid; Biodiesel

1 引言

随着人类社会的发展日益加快,化石燃料消耗也迅速加快,并伴随着燃烧所带来的环境污染问题^[1],寻找新的可再生能源已经迫在眉睫^[2].生物柴油作为一种新兴能源正在被越来越多的人所研究^[3].而微藻生物柴油具有绿色环保等优点,是新一代可再生能源,如何提高其油脂产量,是其重要研究方向^[4].

三角褐指藻是一种生长快速、培养简单、油脂含量较高的海洋模式硅藻^[5],不仅可以通过光能自养的方式繁殖,而且还可以在添加外源甘油的情况下兼养生长^[6].并且其全基因组测序已经完成^[7],可以更好地对其基因层面进行分析以及实验,此外其遗传转化体系也很成熟.

甘油激酶作为三角褐指藻同化外源甘油的第一个酶^[8],并且是连接碳代谢与脂代谢的关键酶^[9],其表达量的差异会直接影响到三角褐指藻对于外源甘油的利用速度.根据构建好的 GKOE 测得其甘油激酶基因表达量于对数生长期较 WT 上调,GKRNi 中甘油激酶基因表达量则于对数生长期时较 WT 下调^[10],故对 GKOE 和 GKRNi 进行了深入研究,探讨其稳定期时油脂含量与脂肪酸成分是否符合生物柴油的开发原则^[11],即生物量、油脂含量与中性脂质含量要高,并且脂肪酸组分中 C₁₆₋₁₈ 的相对含量要高,而 PUFA 的含量要低.

2 材料与方法

2.1 材料

藻种:三角褐指藻野生型(WT)来自于中国海洋大学微藻种质库,编号为 MACC/B288.甘油激酶基因过表达藻株(GKOE)与甘油激酶基因干扰藻株(GKRNi)均由四川大学生命科学学院藻类学实验室构建^[12].

f/2 液体培养基(加入质量分数为 3% 的海盐):NaNO₃ (78.4 μg/mL)、NaH₂PO₄ (4.48 μg/mL)、FeC₆H₅O₇·5H₂O (3.9 μg/mL)、维生素

V_{B12} (0.5 ng/mL)、维生素 V_{B1} (100 ng/mL)、维生素 V_H (0.5 ng/mL)、微量元素若干.

培养条件:接种浓度为 2×10⁵ 个/mL;光照强度 2500 lx;光暗比 12 h : 12 h;温度 22±1℃

尼罗红溶液:称取 1 mg 尼罗红粉末后加入丙酮,定容至 10 mL 配制成 0.1 mg/mL 尼罗红溶液.

酸洗玻璃珠:用 1 : 20 的硫酸溶液浸泡过夜,第二天倒掉酸液用蒸馏水洗涤 10 遍然后风干.

盐酸甲醇溶液:以浓盐酸为溶质,甲醇为溶剂,配制成 1 mol/L 的 HCl-CH₃OH 溶液.

脂肪酸甲酯标准品:Sigma 公司,并用正己烷配置为浓度为 10 mg/mL 的脂肪酸甲酯标准品溶液.

内标十五烷酸(C_{15:0}):用正己烷配置为浓度为 10 mg/mL 的内标溶液

GC-MS:仪器:日本岛津 shimadzu;色谱柱号:hp-88.

试剂:均来自四川大学设备科.

2.2 方法

2.2.1 生长曲线的绘制 将稳定期的 GKOE、GKRNi 和 WT 接种至 100 mL f/2 液体培养基或添加浓度为 20 mmol/L 外源甘油的 f/2 液体培养基中,其中培养 GKOE 与 GKRNi 藻株的培养基中添加 100 mg/L Zeocin.每隔 24 h 取样检测 450 nm 处的吸光度(OD₄₅₀),并用血球计数板计数,绘制生长曲线.

2.2.2 油脂的提取与测定 藻细胞的收集:取 100 mL 藻液,低温冷冻离心 10 000 r/min×5 min 收集藻细胞,并用双蒸水重悬洗涤 3 次;收集藻细胞后真空干燥 75℃抽真空 2 h 至恒重称重;

采用溶剂浸提法提取油脂^[13]:将烘干的藻细胞放入研钵中研磨;将每种研磨好的藻粉转入干净的 1.5 mL 离心管中并加入 600 μL 分析纯石油醚和 300 μL 无水乙醚,涡旋混匀;25℃条件下浸提 5 h,期间涡旋混匀数次;然后向每个离心管中加入 300 μL 10% KOH 溶液,涡旋混匀,再 10 000 r/min×10 min 离心;取上清至干净的称重过的

1.5 mL离心管中并用相同溶剂抽提原管剩余油脂合并;旋转真空干燥仪中 55 °C 烘干称重,计算油脂净重与藻细胞中油脂产量. 油脂含量公式如式(1),油脂产量公式如式(2):

$$\text{油脂含量}(\%) = \frac{\text{油脂重量}(\text{mg})}{\text{干重}(\text{mg})} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{油脂产量}(\text{mg}/\text{mL}) = \frac{\text{油脂净重}(\text{mg})}{\text{藻液体积}(\text{mL})} \quad (2)$$

2.2.3 中性脂质的定性测定 采用尼罗红染色测定中性脂质相对含量^[14]:取对数生长期与稳定期藻液各 2×10^6 个, 12 000 r/min \times 5 min 收集藻细胞; PBS 重悬清洗藻细胞后 12 000 rpm \times 5 min, 重复三次; 然后 300 μ L PBS 悬浮藻细胞并加入 10 μ L 0.1 mg/mL 尼罗红溶液混匀, 42 °C 下暗反应 10 min; 全波长酶标仪检测其在发射波长 575 nm、激发波长 530 nm 处的荧光强度^[15]. 计算中性脂质相对产量公式如式(3):

$$\text{中性脂质相对产量}(\text{au}/\text{mL}) = \frac{\text{中性脂质相对含量}(\text{au}/2 \times 10^6 \text{ 个}) \times \text{藻细胞浓度}(\text{个}/\text{mL})}{\text{藻细胞浓度}(\text{个}/\text{mL})} \quad (3)$$

尼罗红荧光镜检:取对数生长期与稳定期藻液各 1 mL, 其余步骤如上, 只是不通过全波长酶标仪荧光强度的测定而是制成玻片用于显微镜下的荧光拍照.

2.2.4 脂肪酸组成测定 总脂质的提取^[16]:藻细胞的收集如 2.2.2 中所示;藻细胞液氮研磨转入 1.5 mL 离心管中,加入 400 μ L 氯仿和 200 μ L 甲醇以及 1 μ L 内标 $C_{15:0}$; 涡旋混匀数次后超声辅助破碎细胞:超 3 s, 停 3 s, 22% 功率, 共 6 min (离心管置于冰中); 将超声处理的液体转入新离心管内并加入约 300 μ L 酸洗玻璃珠, 原管用 234 μ L 氯仿和 117 μ L 甲醇重洗一遍, 涡旋数次后洗液同样转入新管; 液氮冷却 5 min, 转入 4 °C, 裂解 2 h; 4 °C, 12 000 r/min \times 5 min, 上清移入新管; 之后加入 430 μ L 0.9% KCl, 涡旋数次; 4 °C, 12 000 r/min \times 5 min, 下层氯仿层移入新离心管, 原管用 500 μ L 氯仿把 KCl 重洗一遍, 同样涡旋数次后 12 000 r/min \times 5 min, 吸出下层氯仿与原先合并; 最后真空干燥 90 min 除去氯仿.

脂肪酸甲酯化^[17]:提取的总脂质加 350 μ L 正己烷重溶再转移到小玻璃瓶中后加入 875 μ L HCl- CH_3OH , 涡旋混匀; 85 °C, 2 h 甲酯化后转入 -20 °C, 冷却 20 min; 加 350 μ L 0.9% KCl, 涡旋, 静置分层, 小心取上层, 转入新离心管后原管用

200 μ L 正己烷重新抽提一遍, 将两步的正己烷层合并; 真空 20 °C 干燥, -20 °C 保存.

GC-MS 分析:载气: N_2 ; 线速: 20 cm/s; 分流比: 10 : 1; 流量: 2.2 mL/min; 汽化室温度: 250 °C; 程序升温: 起始温度 100 °C, 保持 2 min, 升温速率 10 °C/min 升温至 180 °C, 之后升温速率为 4 °C/min 升温至 250 °C, 保持 5 min; 检测器: 氢火焰离子化检测器(FID); 分析软件: HPCHEM 色谱工作站; 质谱条件: 离子源为 EI 源, 接口温度 250 °C, 离子源温度为 200 °C, 电子能量 70 eV, 扫描范围 50~500 amu; 扫描时间从 3 min 开始; 分析前脂肪酸甲酯用 100 μ L 正己烷重溶, 将标准品和样品进行 GC 分析, 上样量 1 μ L, 分析时运用面积归一法分析^[18].

3 结果与分析

3.1 藻株生长情况分析

对三角褐指藻细胞浓度与 OD_{450} 进行线性回归分析(见图 1), 得到两者之间的线性关系式如式(4):

$$y = 150.6x - 2.855 \quad (R^2 = 0.999) \quad (4)$$

(式中 x 为光吸收值 OD_{450} , y 为藻细胞浓度 N , 单位为 1×10^5 个/mL).

由于 $P < 0.01$, 说明回归模型有意义, 所以可以利用藻液的 OD_{450} 表示三角褐指藻的生长情况.

通过三角褐指藻生长曲线确定培养到第 6 d 的藻作为对数生长期的藻、培养到第 15 d 的藻作为稳定期的藻. 当培养基中添加外源甘油后, WT、GKOE 和 GKRNi 的生物量均高于同时期正常培养的同种三角褐指藻, 这一结果在 GKOE 中尤为明显(见图 2). 在稳定期时, 甘油兼养的 GKOE 藻浓度可以达到 2.23×10^7 个/mL, 远高于 WT (1.79×10^7 个/mL) 和 GKRNi (1.78×10^7 个/mL).

3.2 油脂含量分析

结果显示, 每 100 mL 藻液中藻细胞干重与油脂含量均随培养时间的增长而升高, 且甘油兼养的三角褐指藻藻细胞干重与油脂含量均高于正常培养的同种三角褐指藻, 故此处仅分析稳定期甘油兼养情况的油脂含量. 甘油兼养的 GKOE 的藻细胞干重可以达到 47.2 mg (见图 3), 与 WT (41.1 mg) 和 GKRNi (42.0 mg) 形成了显著差异. 通过溶剂浸提法提取油脂显示甘油兼养的 GKOE 油脂含量可以达到 31.73% (见图 4), 与甘油兼养的 WT (27.20%) 和 GKRNi (26.63%) 差异显著. 而且甘

油兼养的 GKOE 的油脂产量为 0.15 mg/mL,比甘油兼养的 WT 和 GKRNi 分别高出 35.14% 和 31.58%.

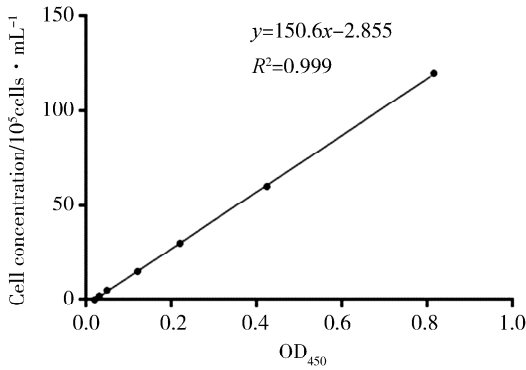


图 1 细胞浓度与 OD₄₅₀ 之间线性关系

Fig. 1 Linear relationship between cell concentration and OD₄₅₀

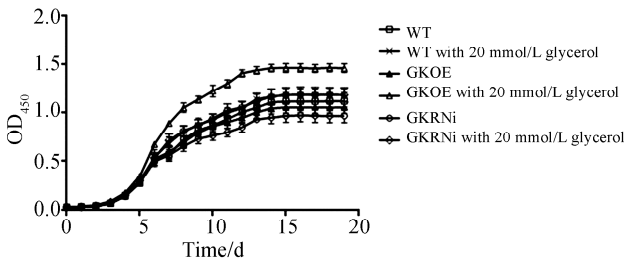


图 2 三角褐指藻生长曲线

Fig. 2 The growth curves of *Phaeodactylum tricornutum*

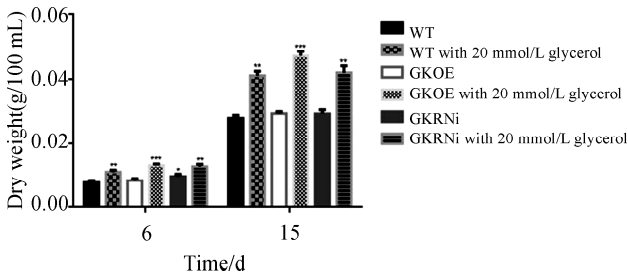


图 3 三角褐指藻细胞干重

Fig. 3 The dry weight of *Phaeodactylum tricornutum*

3.3 中性脂质定性分析

尼罗红是一种脂溶性荧光染料,能够与细胞中的脂类物质结合,在特定的激发波长下显示强烈的荧光,可通过全波长酶标仪进行荧光强度的测定或者荧光显微镜镜检观察.通过尼罗红的荧光强度测定间接反映中性脂质的含量,从而了解生物柴油的含量.

结果显示,随着培养时间的增长,藻细胞中中性脂质含量逐渐提高,故此处仅分析稳定期中性脂质含量.甘油兼养的三角褐指藻相比正常培养条件下同种藻株的中性脂质含量均显著提高;甘油兼养

的 GKOE 中的中性脂质含量分别比甘油兼养的 WT 和 GKRNi 高了 16.3% 和 17.8% (见图 5),其中性油脂产量约高了 44.8% 和 47.2%.

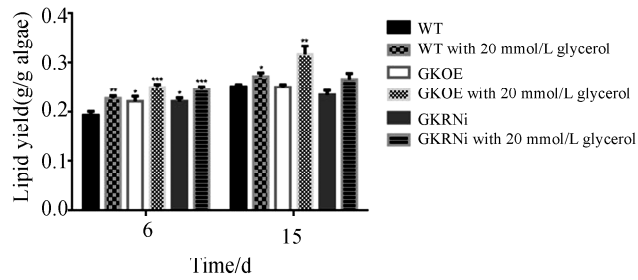


图 4 三角褐指藻油脂含量图

Fig. 4 The lipid yield of *Phaeodactylum tricornutum*

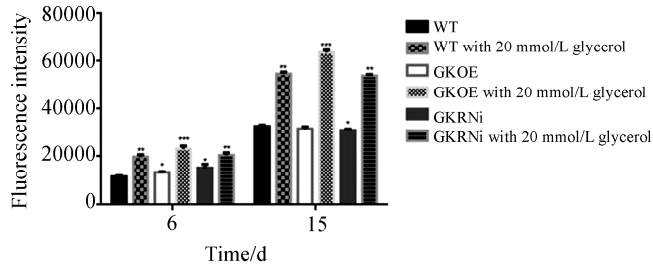


图 5 尼罗红染色荧光强度

Fig. 5 The fluorescence intensity of Nile red dyed

通过尼罗红荧光镜检发现,在对数生长期时,甘油兼养的三角褐指藻已经开始了油脂的积累,而正常培养的三角褐指藻的油脂积累并不明显;甘油兼养的 GKOE 在单个藻细胞中油脂积累与甘油兼养的 WT 和 GKRNi 相比,油脂滴体积更大,油脂滴数更多(见图 6).而处于稳定期的三角褐指藻中的中性脂质都已经积累完成,通过尼罗红荧光镜检无法通过单个藻细胞的油脂滴来区分其含量大小,只能通过藻数来辨别,甘油兼养的 GKOE 中藻数仍然远大于甘油兼养 WT 和 GKRNi;但 WT 和 GKRNi 的中性脂质含量差异却不显著(见图 7).

3.4 藻细胞的脂肪酸组成分析

对脂肪酸甲酯标准品的气相色谱图进行分析得到下图(见图 8),从中成功分离出 33 种脂肪酸甲酯,三角褐指藻中所含的 14 种脂肪酸甲酯在 GC 图谱中的保留时间定位、名称、分子式及结构式缩写见表 1.

通过样品稳定期 GKOE 的脂肪酸色谱图可看到(见图 9),各组分脂肪酸甲酯均分离良好,且出峰时间与脂肪酸标准品一致,故此 GC 条件可以用于脂肪酸成分的分析.

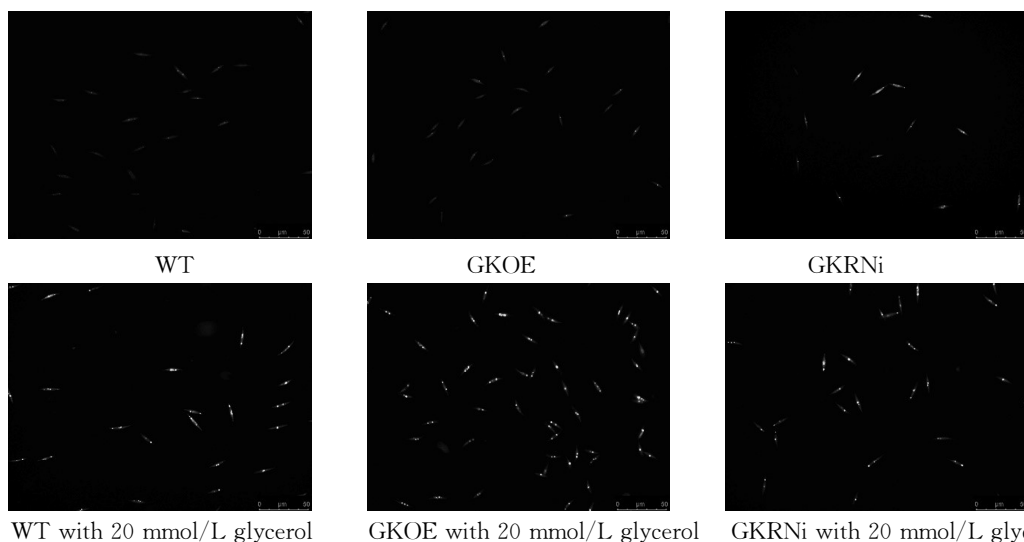


图 6 对数生长期荧光
Fig. 6 Fluorescence at the logarithmic growth phase

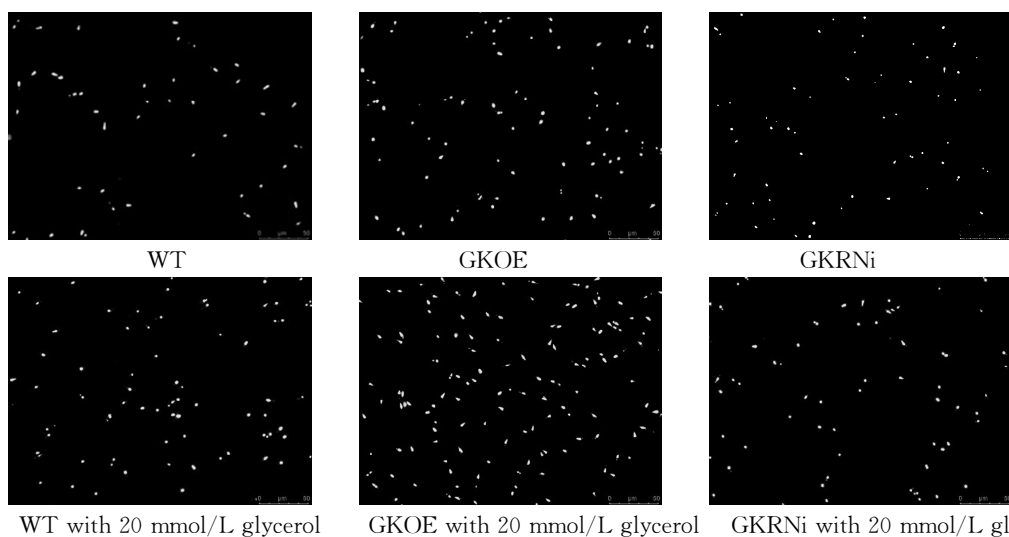


图 7 稳定期荧光
Fig. 7 Fluorescence in stable period

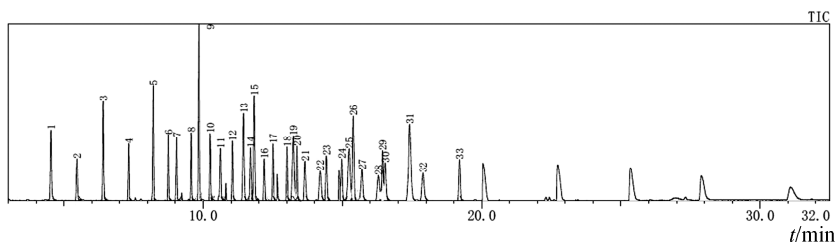


图 8 脂肪酸甲酯混标气相色谱图
Fig. 8 GC chromatogram of fatty acid methyl ester mixed standards

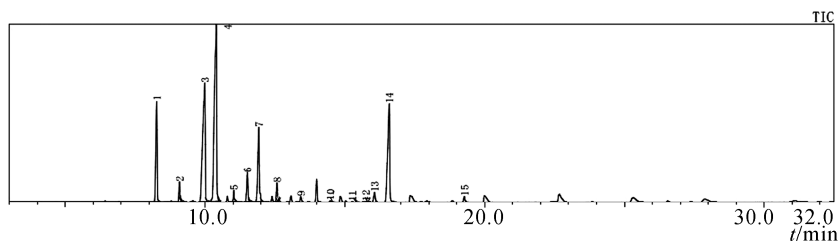


图 9 稳定期时培养基中添加外源甘油的 GKOE 脂肪酸甲酯气相色谱图
Fig. 9 GC chromatogram of fatty acid methyl ester of GKOE in the medium with exogenous glycerol at stable period

表 1 14 种脂肪酸甲酯信息表

Tab. 1 The information table of 14 kinds of FAMES

Number	Compound name	Time/min	Molecular formula	Structure abbreviation
5	Methylmyristate	8.208	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	C _{14:0}
9	Methylpalmitate	9.850	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	C _{16:0}
10	Methylpalmitoleate	10.250	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	C _{16:1}
12	Methylhexadecadienoate	11.050	C ₁₇ H ₃₀ O ₂	C _{16:2}
13	Methyl stearate	11.450	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	C _{18:0}
14	Methyloleate	11.700	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	C _{18:1}
16	Methylinoleate	12.192	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	C _{18:2}
20	Methyl α -linolenate	13.367	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	C _{18:3}
23	Methyleicosadienoate	14.425	C ₂₁ H ₃₈ O ₂	C _{20:2}
24	Methyleicosatrienoate	14.975	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	C _{20:3}
26	Methyleicosatetraenoate	15.392	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	C _{20:4}
29	Methyleicosapentaenoate (EPA)	16.442	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	C _{20:5}
33	Methyldocosahexaenoate (DHA)	19.208	C ₂₃ H ₃₄ O ₂	C _{22:6}
31	Methylxylinate	17.408	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	C _{24:0}

表 2 不同处理组三角褐指藻的 14 种脂肪酸的相对含量

Tab. 2 The relative content of 14 kinds of FAMES in different treatment groups of *Phaeodactylum tricornutum*

Sample number	Main fatty acids composition/%														C _{16~18}	PUFA
	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{16:2}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:2}	C _{20:3}	C _{20:4}	C _{20:5}	C _{22:6}	C _{24:0}		
A1	2.99	22.30	25.82	3.83	13.51	0.96	/	/	/	/	/	30.60	/	/	68.41	30.60
A2	2.56	16.91	38.49	4.02	5.66	1.23	1.96	0.38	0.35	0.44	0.40	26.00	1.58	1.12	68.27	31.13
B1	6.65	22.83	22.69	3.94	13.82	0.91	/	0.63	/	/	/	28.53	/	/	64.19	29.16
B2	7.26	30.17	33.46	0.70	3.00	6.44	1.26	0.40	/	0.28	/	16.50	0.54	/	75.03	18.97
C1	3.61	14.63	27.20	6.93	14.91	0.41	2.51	/	/	0.78	/	29.01	/	/	66.60	32.30
C2	2.40	19.39	40.36	2.05	3.78	2.40	1.97	0.45	0.36	0.48	0.37	25.00	0.99	/	69.94	29.63
D1	13.75	9.79	17.26	6.65	13.42	1.51	6.03	/	/	2.28	/	29.31	/	/	54.66	37.62
D2	10.54	26.43	39.92	0.81	2.36	8.99	1.37	0.52	0.18	/	/	17.38	0.55	/	73.25	18.34
E1	4.48	14.26	26.68	6.29	14.16	0.44	1.79	0.34	/	/	/	30.53	1.03	/	63.62	33.70
E2	4.04	20.30	41.73	2.25	5.36	1.70	2.73	0.37	0.29	/	0.50	19.74	0.99	/	74.07	24.62
F1	7.58	17.42	26.17	0.58	10.89	1.20	4.00	0.68	/	0.74	/	29.98	0.76	/	60.26	36.16
F2	11.29	21.70	33.76	1.43	3.79	7.40	1.57	0.39	0.23	/	0.34	17.46	0.64	/	69.65	20.63

Samples A-F are WT, WT with 20 mmol/L glycerol, GKOE, GKOE with 20 mmol/L glycerol, GKRNi, GKRNi with 20 mmol/L glycerol; number 1 is the logarithmic growth period, number 2 is the stable period

脂肪酸成分的定量分析均采用面积归一法进行分析,将峰面积小于 0.05% 的峰忽略不计,上述 14 种脂肪酸甲酯的成分定量分析见表 2。结果表明,其中的 C_{14:0}、C_{16:0}、C_{16:1}、C_{18:0}、C_{18:2} 和 C_{20:5} 的含量在总的脂肪酸甲酯中占主要部分(均在某一时期含量超过 2%),故这 6 种脂肪酸是三角褐指

藻中的主要脂肪酸。

三角褐指藻中 C_{16:0} 和 C_{16:1} 的含量均会在生长过程中增加,而 C_{18:0} 和 C_{20:5} 的含量则会大幅减少,这种结果体现为稳定期相较于对数生长期, C_{16~18} 含量增加,而 PUFA 的含量减少,有利于生物柴油相关组分的积累。其中变化最为明显的是甘

油兼养的 GKOE, 从对数生长期到稳定期的过程中, 其 $C_{16\sim 18}$ 的含量从 54.66% 增加到了 73.25%, PUFA 的含量则从 37.62% 下降到 18.34%。

由于各脂肪酸甲酯为同系物, 取相对校正因子为 1, 计算总脂肪酸产量公式如式(5):

$$\text{总脂肪酸产量(mg/mL)} = \frac{\text{内标质量(mg)}}{\text{藻液体积(mL)}} \times \frac{\text{脂肪酸甲酯含量(}\%)\text{}}{\text{内标含量(}\%)\text{}} \quad (5)$$

稳定期时甘油兼养的 GKOE 的总脂肪酸产量为 0.052 mg/mL, 比甘油兼养的 WT(0.038 mg/mL) 和 GKRNi(0.047 mg/mL) 分别高了 36.84% 和 10.64%, 差异显著。

4 讨 论

本文研究所用的 GKOE 藻株与 GKRNi 藻株的构建方法为将过表达载体 PtrGKOE-pPhaT1 与干扰载体 PtrGKRNAi-pPhaT1 转化至大肠杆菌后通过基因枪法打入野生型三角褐指藻中。其中过表达载体主要包含 *fcpA* 启动子、GK 基因的开放阅读框 ORF、*fcpA* 终止子、*fcpB* 启动子、博来霉素抗性基因 *sh ble*、硝酸还原酶终止子; 干扰载体主要包含 *fcpA* 启动子、GK 基因约 430 bp 碱基正向序列、内含子、GK 基因约 430 bp 碱基反向序列、*fcpA* 终止子、*fcpB* 启动子、博来霉素抗性基因 *sh ble*、硝酸还原酶终止子。经构建得到的 GKOE 中 GK 基因的转录水平较 WT 上调 7.9 倍, 甘油激酶活性是 WT 的 5.55 倍; 而 GKRNi 中 GK 基因的转录水平相比 WT 下调 53.34%, 甘油激酶活性降低 52.34%, 故三角褐指藻中甘油激酶活性与 GK 基因转录水平呈正相关关系^[12]。但在正常培养条件下, WT、GKOE 与 GKRNi 的生物量却并没有明显差距, 与本文研究相吻合, 证明甘油激酶并不会在正常培养条件下对三角褐指藻的生长产生显著性影响。而甘油兼养条件下, WT、GKOE 与 GKRNi 的生物量、油脂含量、TAG 含量和脂肪酸产量相较正常培养条件下的同种藻株均有显著性的提升, 说明外源甘油的添加有利于三角褐指藻的生长与油脂积累, 其中同化外源甘油的第一个关键酶则是甘油激酶。

Muto M 等在产油硅藻 *Fistulina solaris* 中过表达了内源性的甘油激酶可以使藻株的甘油利用率增加、脂质合成增强^[19], 而本研究所呈现的结果表明在甘油兼养条件下, GKOE 相比 WT 以及

GKRNi, 生物量、油脂含量、TAG 含量以及脂肪酸产量都会大幅度增加, 说明通过提高 GK 基因的表达量确实有助于三角褐指藻的油脂积累。此时 GKOE 中 GK 基因的表达量与甘油激酶活性相较于 WT 均升高, 结合 Abida H^[20]、高莉^[21] 与赵佩佩^[22] 等的研究发现三角褐指藻在缺氮条件下 GK 基因表达量上调, 且糖酵解途径、三羧酸循环与脂肪酸合成途径相关蛋白表达水平均上调, 结果是三角褐指藻藻细胞中油脂含量增加, TAG 含量增多。不同于缺氮条件下三角褐指藻的生物量增加缓慢, 甘油兼养的 GKOE 的藻细胞数量也会大幅增加, 原因可能是因为在添加外源甘油的情况下 GKOE 中 GK 基因表达量的升高更加有利于外源甘油的利用, 增加甘油-3-磷酸(Gly3P) 的生成, 同时增加糖酵解终产物丙酮酸的生成, 但是因为有机碳源与氮源充足, 此条件下生物量以及油脂含量的增加主要是外源甘油中的碳所贡献的, 而非光合作用固定的碳。

而甘油兼养条件下 GKRNi 相比 WT, 生物量、油脂含量、中性脂质含量却没有明显差异, 结合高莉^[21] 与陈波^[10] 的研究, 此时 GKRNi 中的甘油激酶活性与 GK 基因表达量相较于 WT 均下调, GKRNi 对培养基中的外源甘油利用减少, 但是光合作用固碳却相较 WT 增加了, 在甘油浓度为 20 mmol/L 的培养基中, 同化的外源甘油与 CO₂ 的总量与 WT 相当, 故从生物量、油脂含量以及中性脂质含量看不出显著性差异, 随着甘油浓度加大到 100 mmol/L, GKRNi 的生物量较 WT 将会出现显著性差异, 这也需要后续实验的验证。

通过对脂肪酸成分的分析, 发现三角褐指藻从对数生长期到稳定期的过程中会大量积累 $C_{16:0}$ 和 $C_{16:1}$, 尤其是甘油兼养的 GKOE, 其累积量更大, $C_{16\sim 18}$ 的含量可以达到 73.25%, 且 PUFA 的含量降低到 18.34%, 而高含量的 $C_{16\sim 18}$ 与低含量的 PUFA 正是有利于生物柴油的研发的。虽然各组分含量与甘油兼养的 WT 差异不大, 但是因为 GKOE 的总脂肪酸产量达到 0.052 mg/mL, 显著高于 WT 的 0.038 mg/mL, 所以相比 WT 来说更有利于开发生物柴油。

参考文献:

- [1] Kotcher J, Maibach E, Choi W T. Fossil fuels are harming our brains; identifying key messages about the health effects of air pollution from fossil fuels

- [J]. BMC public health, 2019, 19: 1079.
- [2] 李艾军. 我国生物柴油产业存在问题与发展建议[J]. 精细与专用化学品, 2019, 27: 1.
- [3] Leung D Y C, Wu R, Leung R K H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification[J]. Appli Energ, 2009, 87: 1083.
- [4] 马国杰, 常春, 孙绍辉. 能源微藻规模化培养影响因素的研究进展[J]. 化工进展, 2019, 38: 5323.
- [5] 汪翔. 三角褐指藻甘油三酯合成及累积途径相关重要节点的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2018: 10.
- [6] Paranjape K, Leite G B, Hallenbeck P C. Effect of nitrogen regime on microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol. [J]. Biore-sour Technol, 2016, 214: 778.
- [7] Bowler C, Allen A E, Badger J H, *et al.* The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes[J]. Nature, 2008, 456: 239.
- [8] Ramachandran S, Aran I. Enhancement of lipid production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 over-expressing glycerol kinase under oxidative stress with glycerol supplementation [J]. Bioresour Technol, 2018, 267: 532.
- [9] 袁超, 杨洋, 韩小容, 等. 甘油激酶和 3-磷酸甘油脱氢酶基因在大肠杆菌中的克隆表达[J]. 药物生物技术, 2014, 21: 325.
- [10] 陈波. 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricor-nutum*)甘油兼养条件下甘油激酶的功能研究[D]. 成都: 四川大学, 2013: 38.
- [11] 孔莉. 生物柴油组成及组分结构对其关键品质的影响研究[D]. 淮南: 安徽理工大学, 2018: 14.
- [12] 高莉, 张志霞, 卿人韦, 等. 甘油激酶基因对三角褐指藻理化性质的影响[J]. 天津科技大学学报, 2019, 34: 29.
- [13] 石桂珍, 葛军营, 王春利. 微藻油脂提取工艺的研究进展[J]. 煤炭与化工, 2019, 42: 122.
- [14] Rumin J, Bonnefond H, Saint-Jean B, *et al.* The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae[J]. Biotechnol Biofuels, 2015, 8: 42.
- [15] Liu Z Y, Wang G C, Zhou B C. Effect of Iron on Growth and Lipid Accumulation in *Chlorella vul-garis*[J]. Bioresour Technol, 2008, 99: 4717.
- [16] 岳龙. 产油微藻生长调控及其促进剂对长链脂肪酸生物合成的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2012: 30.
- [17] 徐欣. 衣物上粘附微藻的脂肪酸和色素分析[D]. 北京: 中国人民公安大学, 2017: 9.
- [18] 李彩霞, 金瓯, 李煜, 等. 鱼肝油中脂肪酸的气相色谱及气相色谱-质谱分析[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34: 1734.
- [19] Muto M, Tanaka M, Yue L, *et al.* Enhancement of glycerol metabolism in the oleaginous marine diatom *Fistulifera solaris*, JPCD DA0580 to improve triacylglycerol productivity [J]. Biotechnol Biofuels, 2015, 8: 4.
- [20] Abida H, Dolch L J, Mei C, *et al.* Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricor-nutum* [J]. Plant Physiol, 2015, 167: 118.
- [21] 高莉. 三角褐指藻对甘油的能源化转化研究[D]. 成都: 四川大学, 2018: 11.
- [22] 赵佩佩, 顾文辉, 伍松翠, 等. 氮限制有利于三角褐指藻脂质积累[J]. 科学通报, 2015, 23: 2196.

引用本文格式:

中文: 侯兴国, 方琰, 白欢, 等. 过表达甘油激酶三角褐指藻藻株富集油脂的研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2020, 57: 1209.

英文: Hou X G, Fang Y, Bai H, *et al.* Study on lipid accumulation of *Phaeodactylum tricor-nutum* strain over-expressing glycerol kinase [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2020, 57: 1209.